

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-279166

(43)Date of publication of application : 10.10.2000

(51)Int.Cl.

C12N 1/20
/(C12N 1/20
C12R 1:01)
(C12N 1/20
C12R 1:225)

(21)Application number : 2000-079386

(71)Applicant : SOC PROD NESTLE SA

(22)Date of filing : 22.03.2000

(72)Inventor : ELLI MARIA
ZINK RALF
MARCHESINI-HUBER BARBARA
RENIERO ROBERTO

(30)Priority

Priority number : 99 99105855 Priority date : 23.03.1999 Priority country : EP

(54) SYNTHETIC MEDIUM FOR LACTOBACILLUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a synthetic medium capable of growing a plurality of different bacterial strains sufficiently, containing a carbon source, a buffer, a nitrogen source, a very small amount element, an antioxidant and vitamins, and useful for culturing lactobacillus by including sufficient amounts of a plurality of free bases, etc., for accelerating the growth of each of the microorganisms.

SOLUTION: This synthetic medium contains ≥ 2 free bases such as adenine, one kind of ribonucleoside and two kinds of 2'-deoxynucleosides in sufficient amounts for accelerating the growth of each of microorganisms, and also a carbon source such as glucose, a buffering agent such as $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, a nitrogen source such as an amino acid, a very small amount element such as a calcium compound, an antioxidant such as ascorbic acid and a vitamin such as nicotinic acid. Further, it contains the ribonucleoside and deoxynucleotide by 0.3-0.5 g/l, preferably 0.1 g/l, and by using the medium, it is preferable to grow a lactobacillus belonging to the genus Lactobacillus and/or Bifidbacteria, and also perform an identification and/or isolation of a bioactive molecule or a functional metabolic product.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.05.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3690958

[Date of registration] 24.06.2005

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-279166

(P2000-279166A)

(43) 公開日 平成12年10月10日 (2000. 10. 10)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード (参考)
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A
// (C 1 2 N 1/20			
C 1 2 R 1:01)			
(C 1 2 N 1/20			
C 1 2 R 1:225)			

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2000-79386 (P2000-79386)

(22) 出願日 平成12年3月22日 (2000. 3. 22)

(31) 優先権主張番号 9 9 1 0 5 8 5 5 . 3

(32) 優先日 平成11年3月23日 (1999. 3. 23)

(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (E.P)

(71) 出願人 590002013

ソシエテ デ プロデュイ ネットスル ソ

シエテ アノニム

スイス国ブベリ, ビー オー ボックス

353

(72) 発明者 マリア エリー

スイス国 ローザンヌ, アブニュ ド ラ

ザラツ 50

(72) 発明者 ラルフ ジンク

スイス国 ル モン ベレラン, シュマン

メイゾン ジャン 36

(74) 代理人 100066692

弁理士 浅村 皓 (外 3 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳酸菌用合成培地

(57) 【要約】

【課題】 乳酸菌が宿主生体に特別の機能を発揮する生産生物活性成分および代謝成分を単離、同定するための合成培地。

【解決手段】 ラクトバチルスまたはビフィドバクテリアなどの乳酸菌を特に2種の遊離塩基、1種のリボヌクレオシドおよび2種の2'-デオキシヌクレオシドを含有することを特徴とする組成を有する合成培地に培養する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 少なくとも 2 種の遊離塩基、1 種のリボヌクレオシドおよび 2 種の 2'-デオキシヌクレオシドをそれぞれ微生物の生育を促進する十分量で含有することを特徴とする、炭素源、緩衝剤、窒素源、微量要素、抗酸化剤およびビタミンを含む、ラクトバチルスまたはビフィドバクテリア属に属する乳酸菌を培養するための合成培地。

【請求項 2】 炭素源はグルコース、フラクトース、ラクトース、サッカロースまたはその混合物から成る群から選択する、請求項 1 記載の培地。

【請求項 3】 緩衝剤は $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、クエン酸水素 2 アンモニウム、 $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ またはその混合物から成る群から選択する、請求項 1 または 2 記載の培地。

【請求項 4】 窒素源は 1 種以上のアミノ酸、クエン酸水素 2 アンモニウムまたはその任意の混合物から選択する、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の培地。

【請求項 5】 抗酸化剤はアスコルビン酸、システイン、チオール化合物またはその任意の混合物から選択する、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の培地。

【請求項 6】 微量要素は Cu 、 Zn 、 Mn 、 Mg 、 Co 化合物またはその任意の混合物から選択する、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の培地。

【請求項 7】 ビタミンはニコチン酸、パントテネート、コバラミン、 p -アミノ安息香酸、ピリドキサル HC1、リボフラビン、ビオチン、葉酸またはその任意の混合物から成る群から選択する、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の培地。

【請求項 8】 ヌクレオチドおよびデオキシヌクレオチドは約 0.3 g/1、好ましくは約 0.1 g/1 の量で含む、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の培地。

【請求項 9】 ラクトバチルスおよび/またはビフィドバクテリア属に属する乳酸菌の生育用に、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の培地の使用。

【請求項 10】 生物活性分子または機能性代謝産物の同定および/または単離のために請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の培地の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】 本発明は特別のヌクレオチドおよびデオキシヌクレオチドを含有するビフィドバクテリア属またはラクトバチルス属の乳酸菌の培養に適する新規合成培地に関する。特に、本発明は生物活性分子または機能性代謝産物の単離のためにこの培地を使用することに関する。

【0002】

【従来の技術】 ラクトバチルス菌は天然に広く分布し、工業的発酵方法、例えば乳製品の製造に主として使用さ

れる。最近特別の菌株が宿主生物の健康状態の維持に正の効果を示すことが分かってから、その代謝の研究は非常に高まった。その複雑な栄養要求は、酵母エキスおよび各種起源のペプトンのような不確定かつ複雑な組成のマトリックスを含有する天然起源または合成生育培地により通例満たされている。

【0003】 細菌細胞の栄養要求の研究、培地からその除去後または或る種の物質に対して栄養要求のある変異体の単離後、その効果を検知して特定成分の役割を確認するような異なる目的に対しいくつかの半合成および完全に化学的に規定された乳酸菌培地が開発されている。規定された化学組成を有する生育培地も使用して、ヌクレオチドに対するラクトバチルス菌の要求度を決定しかつ異なる DNA 前駆体に関しその必須的または非必須的役割に属するかをみた。

【0004】 過去数十年間に、生物学的試料の DNA 残基の存在を測定するため試験生物としてホフーヨルゲンセンが最初に提案された（ホフーヨルゲンセン、「デオキシリボヌクレオチドおよびデオキシリボ核酸の微生物的研究」、*Biochem. J.* 50 (1952), 400~403) 菌株ラクトバチルス・ジョンソニア TC C 11506 (以前はラクトバチルス・アシドフィルス R-26 として知られていた) に対し規定された培地により研究が行なわれた。この菌株はリボヌクレオチドレダクターゼ活性を機能的に欠くため生育培地に少なくとも 1 種のデオキシリボヌクレオチドの存在を必要とすることをイブスおよびイケダが「ライフ・オン・ザ・サルベジ・パス：ザ・デオキシヌクレオチド・キナーゼズ・オブ・ラクトバチルス・アシドフィラス R26」、*Progr. Nucl. Acid. Res.* (1998), 207~252 に報告している。

【0005】 さらに、ラクトバチルス・デルブレッキ亜種ラクティス ATCC 7830 (以前には L. ライヒマニ ATCC 7830 として知られる) では、菌株 R-26 に対比してデオキシリボヌクレオチドに対する要求はビタミン B12 により代替できることが示された。

【0006】 後者の菌株をいくつかの実験に供し、ラクトバチルス菌のヌクレオチド要求度および培地を DNA 分子で補充する効果を明らかにした (ジーナ & ジーナ、*Exptl. Cell Res.* 3 (1952), 675~680; オカザキ & オカザキ、*J. Biochem.* 35 (1959), 434~445; ホフーヨルゲンセン、*Meth. Enzymol.* 3 (1957), 781~785; マクナット、*Meth. Enzymol.* 2 (1955), 464~468; ロブトラップ & シュガー、*J. Bacteriol.* 82 (1961), 623~631)。

【0007】 チミジンはしばしばラクトバチルス・アシドフィラスおよび L. ライヒマニの生育の鍵因子として指摘された。さらに、その後の研究では、ウラシルの

除去が乳酸菌のRNA合成および細胞分裂に深くかわることが実証された。

【0008】シードラーらはJ. Bacteriol. 73 (1957), 670~675でウラシル、ビタミンB6、および酸加水分解カゼインが半規定培地でL. アシドフィルスの増殖に及ぼす酵母抽出物の明確な効果の再現能力を試験することによりホフ-ヨルゲンセンの培地が最適であることを報告した。

【0009】最近、イムバートおよびブロンデューは鉄のキレート化後生育するいくつかのラクトバチルス種の能力を試験する化学的に規定された培地をCurr. Microbiol. 37 (1998), 64~66に開示し、さらにマンガンと鉄間の相互作用が試験された。キレートした鉄の補充はマンガンの存在で細菌の生育に影響を与えなかったが、一方好気培養後のL. アシドフィルスATCC 4356 Tに対し特にマンガンを除いた同じ培地にその添加後僅かにプラスの効果が観察された。

【0010】大部分の病原菌はその生育に鉄を必要とすることは既知である。これと対照的に、乳酸菌はこのよう

な不可欠の鉄要求を示さないことで生存微生物のうちで一般に例外と見なされ、これは従って自然環境で病原体に対し生態学的利点を表わすと考えられる。

【0011】乳酸菌の平均金属含量を報告する刊行物はほとんど存在しない。一般に、ラクトバチルス種のうちに強い可変性が見出され、より低量が確認されるラクトバチルス・ブランタルムと大腸菌細胞の鉄含量を比較することにより例証された(アルキバルドラ、FEMS Microbiol. Lett. 19 (1983), 29~32)。

【0012】最近、ラクトバチルスおよびビフィドバクテリア属の特別な菌株が非常に注目されたが、これは宿主生物に有利な性質がこれらによるものであったからである。それまでこれらの菌株が報告された性質を示すことを単に知られていたが、この性質の理由は明らかにされなかった。

【0013】この点でEP 0577903号明細書は乳酸菌、特に摂取する場合ヘリコバクター・ピロリに感染した生物に有利な効果をもたらすラクトバチルス菌株の使用を開示する。従って、ラクトバチルスは、ヘリコバクターが胃および/または腸粘膜構造にさらに生育しおよび/または粘着するのを防止しうる代謝化合物を生産できることが明らかである。代謝化合物を測定する見地から、乳酸菌が生産した化合物を単離できる培地を持つことが望ましい。

【0014】この化合物を単離するために、細菌細胞は培地で適度な程度まで培養する。しかし、乳酸菌の十分な生育を供する培地は通常規定されず、酵母抽出物およびペプトンのような複雑な基質を含み、これらから望ましい、未知の化合物は単離できない。

【0015】他方、これまで知られていた規定培地はある細菌菌株に対し通常特異的であり、さらに微生物の十分な生育を供しない。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の課題は新規な規定培地を供することで、この培地は複数の異なる細菌菌株が十分に生育できるものである。

【0017】

【課題を解決するための手段】この課題は2種の遊離塩基、1種のリボヌクレオシドおよび2種の2'-デオキシヌクレオシドをそれぞれ微生物の生育を促進する十分量で含有することとを特徴とする、炭素源、緩衝剤、窒素源、微量要素、抗酸化剤およびビタミンを含むラクトバチルスまたはビフィドバクテリア属に属する乳酸菌を培養する合成培地を供することにより解決された。

【0018】本発明に至る広汎な研究中、ラクトバチルス・ジョンソニー用の化学的に規定された生育培地が開発され、これは驚くことに他のラクトバチルス菌および/またはビフィドバクテリアの培養にも同様に十分に適することが分かった。試験では、培地のヌクレオチド組成に特別の注意が払われ、数種のDNA前駆体起源はラクトバチルス/ビフィドバクテリアの生育を支持するその能力が試験された。

【0019】このためL. ジョンソニー用の規定培地には遊離塩基(アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシルおよびイノシン)、リボヌクレオシド(アデノシン、シチジン、グアノシン、ウリジン)およびデオキシリボヌクレオシド(2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシシチジン、2'-デオキシングアノシン、2'-デオキシウリジンおよびチミジン)を補充した。試験した異なるラクトバチルスは5種のすべての遊離塩基、4種のすべてのリボヌクレオシドおよび5種のすべてのデオキシリボヌクレオシドが同時に存在する規定培地で生育する能力を示し、それにより実質的な生育に対する最少要求は少なくとも2種の遊離塩基、1種のヌクレオシドおよび2種のデオキシリボヌクレオシドの組合せであることが分かった。

【0020】アデニンおよびグアニンの双方は前駆体としてイノシンにより代替でき、チアミンおよびシトシンに対する要求はウラシルを培地に補充することにより充足されることを示すことができた。イノシンおよびウラシルの存在はいくつかのラクトバチルス種の生育に有利であることが分かり、実質的にプリンおよびピリミジンを合成する能力のないことが新たに確認された。

【0021】上記最少所要化合物を補充した規定培地により最終細胞数を増加することができた。しかし最適結果は次のヌクレオチド誘導体、すなわちグアニン、チミン、シチジン、デオキシアデノシンおよびデオキシウリジンの組合せにより得られた。

【0022】この特別のレシピを使用してそのヌクレオ

チド組成の異なる数種の規定レシピによりラクトバチルス
の鉄要求も試験した。鉄化合物の除去後最少数の必要ヌ
クレオチド前駆体を供給する場合37℃で18時間培養
後光学的濃度値にはほとんど差が認められなかった。

【0023】イノシンおよびウラシルが唯一のヌクレオ
チド源として供給される場合、鉄除去の一層強い効果が
検知された。それ以上の研究により鉄除去のマイナス効
果はウラシルをシトシンで代替後強調されることを示す
ことができた。従って、ラクトバチルス／ピフィドバク
テリアのピリミジンまたはプリン代謝における鉄の推定
役割が提案された。ラクトバチルス種、特にL. ジ
ョンソニは特別の環境条件下でのみ鉄を必要とすると
結論される。今尚、少なくとも2種の遊離塩基、1種の
リボヌクレオチドおよび2種のデオキシリボヌクレオチ
ドをヌクレオチド前駆体として合成培地に補充すると、
培地に鉄の添加を必要とせずに異なるラクトバチルスお
よびピフィドバクテリアの実質的生育を示すことがで
きた。この特徴は、その生育に鉄を必要とする細菌による
カルチャーの汚染をそれにより排除できる事実のためむ
しろ有利であることを証明する。

【0024】培地の炭素源として、当業者に周知の、例
えばフラクトース、ラクトース、サッカロースまたはそ
の混合物の任意の起源は選択できる。特別の菌株の特異
性に適応したpH値を供するために、培地はKH₂PO₄、
／K₂HPO₄、クエン酸水素2アンモニウム、NaHCO₃、
／Na₂CO₃、またはその混合物のような当業者が使用
する任意種の緩衝剤を含有できる。

【0025】培地はさらに、好ましくは任意の天然アミ
ノ酸またはクエン酸水素2アンモニウムまたはその混合
物から選択できる窒素源を含有する。

【0026】生育に適する環境を供するために、培地は
さらに抗酸化剤を含有する。例えば、アスコルビン酸、
システイン、チオール化合物またはその混合物のような
抗酸化剤は当業者に周知である。合成培地を含む異なる化
合物数を低減する目的に対してはシステインはそれだけ

で好ましい抗酸化剤である。

【0027】さらに、培地は微生物の生育に必要な微量
要素を含有する。この微量元素は例えばCu⁺、Zn⁺、
Mn⁺、Mg⁺、Co⁺化合物、またはその混合物
である。培地の化合物量を低減する目的に対し例えば、
クエン酸塩のような培地に添加する別の有機化合物から
選択することが好ましく、またはC1⁻などのようなマ
イナス荷電イオンでもよい。

【0028】培地は付加的にニコチン酸、パントテネー
ト、コバラミン、p-アミノ安息香酸、ピリドキサル
HCl、リボフラビン、ビオチン、葉酸またはその混合
物のような各種ビタミンを含有する。

【0029】当業者は自身の知識に基づいて、明記しな
かったが、尚同じ目的に供する化合物を使用することは
認識されるであろう。培地に含むヌクレオチド前駆体の
好ましい量は約0.5g〜約0.3g/l、好ましくは
約0.1g/lの範囲であることが分かった。

【0030】その規定された組成のため本培地はラクト
バチルスおよび／またはピフィドバクテリアがそれぞれ
生産した生物活性分子および／または機能性代謝産物の
同定および／または単離に対し使用できる。この点で細
菌は培地に生育させる。この培地は適当な生育環境を供
するので、高細胞数を達成でき、その結果実質量の生物
活性分子／機能性代謝産物も生産できる。

【0031】微生物が分泌した代謝産物の単離に対し規
定培養培地を高速で遠心分離して任意の細菌細胞からす
べて取り出した。次に上澄を集め、さらに当業者に周知
の技術により生物学的化合物の分析を行なった。

【0032】

【実施例】本発明は例として記載し、本発明を限定する
ものではない。

例

細菌菌株

試験では次の異なる菌株を使用した。

【表1】

表 1 研究細菌菌株の起源

<i>L. johnsonii</i> ATCC 33200 ^T	ATCC
<i>L. johnsonii</i> ATCC 11506	ATCC
<i>L. johnsonii</i> La1 (NCC 533)	ネスレ カルチャー コレクション
<i>L. johnsonii</i> ATCC 332	ドイツ微生物寄託機関
<i>L. johnsonii</i> DSM 20553	ドイツ微生物寄託機関
<i>L. gasseri</i> DSM 20243 ^T	ドイツ微生物寄託機関
<i>L. gallinarum</i> DSM 33199 ^T	ドイツ微生物寄託機関
<i>L. casei</i> ATCC 393 ^T	ATCC
<i>L. paracasei</i> NCDO 151 ^T	NCFB
<i>L. plantarum</i> NCDO 1193	NCFB
<i>L. helveticus</i> ATCC 10386	ATCC
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> DSM 20074 ^T	ドイツ微生物寄託機関
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7830	ATCC

微生物はMRS（ディフコ）ブロスまたは寒天に37℃で増殖させた。各18時間の2回の継代培養を試験実施前冷凍カルチャーにより行なった。

培地

規定培地（DM1）の組成は表2に示す。

20 【表2】

表2 規定培地の培地組成

成 分	最終濃度 (g/l)
グルコース	10
リン酸水素カリウム	3.1
クエン酸水素2アンモニウム	2
リン酸2水素カリウム	1.5
塩化ナトリウム	0.02
アスコルビン酸	0.5
酢酸カリウム	10
ツイーン 80	1
硫酸マグネシウム 7水塩	0.5
硫酸マンガン 水和物	0.02
硫酸コバルト	0.5
乳酸カルシウム	1
DL-アラニン	0.2
DL-アミノ酪酸	0.1
グリシン	0.2
L-ヒスチジン HCl	0.2
L-リジン HCl	0.2
L-フェニルアラニン	0.1
L-プロリン	0.2
L-セリン	0.1
L-スレオニン	0.1
L-システイン	0.1
L-アルギニン	0.2
L-アスパラギン酸	0.3
L-アスパラギン	0.1
L-グルタミン酸	0.3
L-イソロイシン	0.1
L-ロイシン	0.2
L-メチオニン	0.1
L-チロシン	0.1
L-トリプトファン	0.1
L-バリン	0.1
ニコチン酸	10 mg
パントテン酸カルシウム	10 mg
シアノコバラミン	0.02 mg
パウ-アミノ安息香酸	0.2 mg
ミオ-イノシトール	10 mg
ピリドキサル HCl	10 mg
リボフラビン	10 mg
ピオチン	1 mg
葉 酸	0.2 mg
グアニン	0.1
チミン	0.1
シチジン	0.1
2'-デオキシアデノシン	0.1
2'-デオキシウリジン	0.1

上記培地は鉄を含まず、鉄は各回毎に新たに調製し、すぐに培地に添加した。滅菌蒸留水に溶解した硫酸第一鉄 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0.02 g/l 最終濃度) として補充した。滅菌は濾過-滅菌またはオートクレーブ処理 (121°C) であった。各表示成分はシグマケミカルズより供給された。レシピに示したヌクレオチドはL. ジョンソニィの高度の生育を支持しうる最適組合せを表わす。他のヌクレオチド誘導体を試験した。

遊離塩基：アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミン、

リボヌクレオチド：アデノシン、シチジン、グアノシン、ウリジン、および

デオキシリボヌクレオチド：2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン、2'-デオキシシチジン、2'-デオキシウリジン、チミジン、

これらは表2に示す同じ最終濃度の中性またはアルカリ性溶液として供給した。

【0033】生育細胞および光学的濃度測定

生育細胞数はMRS (ディフコ) 寒天プレートで 37°C で48時間嫌気培養後十進法計算により測定した。光学的濃度はDye UNICAM PU8660分光光度計を使用して 560 nm で測定した。報告した生育結果は3回試験の平均である。

【0034】接種物の調製

試験した規定培地に、MRSカルチャーから1%接種し、2回洗浄し、最後に同量の滅菌蒸留水で再懸濁して培地を介して栄養素が移行するのを回避した。

培養パラメータ

チューブは 37°C で18時間培養した。

【0035】上記培地は高生育量を達成する能力についてL. ジョンソニィに対する組成では最適であった。 37°C で18時間培養後、平均 1.8 対数をすべての上記表示菌株に対し得た。

50 【0036】表2から推論できるように、培地は異なるD

NA誘導体の組合せを含有する(2種の遊離塩基、1種のリボヌクレオシドおよび2種の2'-デオキシリボヌクレオシド)。プリン前駆体としてイノシンおよび唯一の必須ピリミジン塩基としてウラシルを供するその他のヌクレオシドミックスを試験した。修正培地は18時間の培養後1.5~2対数範囲で増加する菌株の生育を支持した。

【0037】すべてのDNAおよびRNA前駆体を省略すると、ほとんどすべての試験種はほとんど完全に生育阻害を生じた。但し*L. casei*亜種カゼイ、*L. casei* 10 亜種バラカゼイおよび*L. plantarum*はこの欠乏に影*

表3 規定培地DM1から鉄の除去の影響

菌 株		最終生育収量 (a)	
		DMI	DMI (b)
<i>L. johnsonii</i>	ATCC 33200 ¹	1.65	1.75
<i>L. johnsonii</i>	ATCC 11506	0.67	0.65
<i>L. johnsonii</i>	Lal (NCC 533)	1.71	1.76
<i>L. johnsonii</i>	DSM 20553	1.10	1.20
<i>L. gasserii</i>	DSM 20243 ¹	1.50	1.41
<i>L. gallinarum</i>	DSM 33199 ¹	1.97	2.00
<i>L. casei</i>	ATCC 393 ¹	1.95	1.93
<i>L. paracasei</i>	NCDO 151 ¹	1.12	1.30
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	DSM 20074 ¹	1.40	1.52
<i>L. plantarum</i>	NCDO 1193	1.30	1.35
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 7830	1.90	1.94

(a) 560nmの光学密度で表わした結果。

(b) 硫酸第一鉄を欠くDM1レシピ。

【0039】異なるヌクレオチド源を培地に添加して、DM1ヌクレオチド組成を代えた。5種の遊離塩基(アデニン、シトシン、グアニン、チミンおよびウラシル)、4種のリボヌクレオシド(アデノシン、シチジン、グアノシンおよびウリジン)または5種の2'-デオキシリ

*響を受けなかったが、これらは「de-novo」合成によりプリンおよびピリミジンを合成できることを確認し、活性化リボース分子に直接ヌクレオチド環を形成させた。

【0038】他の試験菌株はRNAおよびDNA合成に必要なヌクレオチドプールを合成するために少なくともイノシンおよびウラシルを必要とした。鉄の省略は表3から分かるように、この欠乏培地で生育する試験菌株の能力に影響を与えなかった。

【表3】

ボヌクレオシド(デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシシチジン、デオキシウリジン、チミジン)を供給し、相当する培地はDM3、DM4およびDM5とそれぞれ名づけた(表4)。

【表4】

表4 遊離塩基、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシドのラクトバチルス菌の生育および鉄除去後の性能に及ぼす影響

菌 株	最終生育収量 (a)					
	DM3	DM3 (b)	DM4	DM4 (b)	DM5	DM5 (b)
<i>L. johnsonii</i> ATCC 33200 T	1.00	0.97	1.13	1.10	0.92	0.48
<i>L. johnsonii</i> La1 (NCC 533)	0.78	0.75	1.16	0.86	1.14	0.95
<i>L. johnsonii</i> ATCC 11506	0.68	0.69	0.67	0.56	0.93	0.94
<i>L. johnsonii</i> DSM 20553	0.78	0.74	1.04	0.85	1.07	1.04
<i>L. gasseri</i> DSM 20243 T	0.92	0.95	0.92	0.87	0.88	0.86
<i>L. gallinarum</i> ATCC 33199 T	0.41	0.37	0.78	0.71	1.05	0.93
<i>L. casei</i> ATCC 393 T	0.91	0.87	1.24	1.23	1.21	1.22
<i>L. paracasei</i> NCD0 151 T	1.00	1.02	0.98	0.94	1.03	1.08
<i>L. delbrueckii</i> DSM 20074 T	0.15	0.15	0.34	0.29	0.26	0.25
<i>L. lactis</i> ATCC 7830	0.84	1.03	1.12	1.12	0.96	1.11
<i>L. helveticus</i> ATCC 892	0.04	0.04	0.11	0.07	0.05	0.06

(a) 560nmで光学密度として表わした結果。

(b) 硫酸第一鉄を省略した。

【0040】異なるDNA誘導体に対する試験菌株の性能は560nmで光学密度値を測定して決定した。表5は菌株を修正培地および硫酸第一鉄形の鉄を省略した培地で生育させた場合、双方が達成した最終生育収量を示す。

*す。結果はラクトバチルス菌が明白な鉄要求を欠くため強い除去効果を全く示さなかった。

【表5】

表5 ラクトバチルス菌生育に及ぼす培地 DM2 から硫酸第一鉄の除去効果

菌 株	最終生育収量 (a)	最終生育収量 (a)
	DM2	DM2 (b)
<i>L. johnsonii</i> ATCC 33200 T	0.82	0.46
<i>L. johnsonii</i> La1 (NCC 533)	1.13	0.67
<i>L. johnsonii</i> ATCC 11506	0.57	0.15
<i>L. johnsonii</i> ATCC 332	1.10	0.65
<i>L. johnsonii</i> DSM 20553	1.20	0.36
<i>L. gasseri</i> DSM 20243 T	0.82	0.57
<i>L. gallinarum</i> ATCC 33199 T	0.82	0.50
<i>L. casei</i> ATCC 393 T	1.24	1.23
<i>L. paracasei</i> NCD0 151 T	1.16	1.02
<i>L. delbrueckii</i> DSM 20074 T	0.85	0.52
<i>L. plantarum</i> NCD0 1193	1.38	1.38
<i>L. lactis</i> ATCC 7830	1.20	1.14
<i>L. helveticus</i> ATCC 892	1.13	0.84

(a) 560nmの光学密度として表わした結果。

(b) 硫酸第一鉄を除去。

予期したように*L. ジョンソニ* ATCC 11506はこの培地で生育の発現はむしろ少なかったが、鉄の除去効果は僅かに認めることができた。

【0041】鉄欠乏はヌクレオチド源としてイノシンおよびウラシルの存在を特徴とするDM2培地にも適用した(表4および6)。この場合、一層強い効果は特に

L. ジョンソニィ、L. ガセリ L. ガリナルム、および * した。

L. ヘルペティカスに対し認められ、これらは硫酸第一 【表6】

鉄を欠く DM2 培地で培養後光学密度の有意な低減を示*

表 6 硫酸第一鉄添加、および無添加の規定 DM1 培地における L. ジョンソニィの生育に
及ぼす アデニン、グアニン、イノシン、ウラシル、シトシンおよびオロチン酸の影響

培 地	L. Johnsonii 菌 株				
	ATCC 33200 T	La1 (NCC 833)	ATCC 11504	ATCC 332	DSM 20553
(A) + FeSO ₄	0.72	1.14	0.57	0.97	1.11
(A) - FeSO ₄	0.48	0.19	0.21	0.41	0.41
(B) + FeSO ₄	0.86	1.05	0.58	0.23	1.15
(B) - FeSO ₄	0.12	0.13	0.16	0.10	0.16
(C) + FeSO ₄	0.43	1.07	0.52	0.77	1.06
(C) - FeSO ₄	0.51	0.17	0.21	0.52	0.39
(D) + FeSO ₄	0.25	0.23	0.31	0.24	0.26
(D) - FeSO ₄	0.16	0.12	0.18	0.15	0.21
(E) + FeSO ₄	0.36	0.34	0.31	0.47	0.35
(E) - FeSO ₄	0.40	0.25	0.30	0.50	0.48
(F) + FeSO ₄	0.44	0.39	0.49	0.62	0.89
(F) - FeSO ₄	0.43	0.30	0.41	0.25	0.38
(G) + FeSO ₄	0.33	0.49	0.49	0.67	0.89
(G) - FeSO ₄	0.40	0.29	0.33	0.32	0.47
(H) + FeSO ₄	0.31	0.28	0.43	0.25	1.06
(H) - FeSO ₄	0.21	0.22	0.32	0.24	0.23

(A) DM1 + イノシン、ウラシル = DM2

(B) DM1 + イノシン、シトシン

(C) DM1 + イノシン、ウラシル、シトシン

(D) DM1 + シトシン

(E) DM1 + イノシン、オロチン酸

(F) DM1 + アデニン、グアニン、オロチン酸

(G) DM1 + アデニン、グアニン、ウラシル

(H) DM1 + アデニン、グアニン、シトシン

フロントページの続き

(72)発明者 バーバラ マルシェシニ - ユベール
スイス国 サビニユイ、シュマン ド ラ
ギュエタ、5

(72)発明者 ロベルト レニーロ
スイス国 ル モン ベレラン、シュマン
ボディーユ、24

THIS PAGE BLANK (USPTO)